

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international



D2

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : <b>A61K 31/725</b></p>	<p><b>A1</b></p>	<p>(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 95/26738</b> (43) Date de publication internationale: 12 octobre 1995 (12.10.95)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/00400 (22) Date de dépôt international: 29 mars 1995 (29.03.95) (30) Données relatives à la priorité: 94/03805 30 mars 1994 (30.03.94) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): UNIVERSITE PARIS VAL DE MARNE [FR/FR]; 61, avenue du Général- de-Gaulle, F-94010 Créteil Cédex (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BARRITAU, Denis [FR/FR]; 4, rue Française, F-75001 Paris (FR). CARU- ELLE, Jean-Pierre [FR/FR]; 32, rue Jules-Joffrin, F-94100 Saint-Maur (FR). HORNEBECK, William [FR/FR]; 19, rue des Bourdonnais, F-78000 Versailles (FR). MEDDAHI, Anne [FR/FR]; 23, square Edison, F-94000 Créteil (FR). (74) Mandataire: PHELIP, Bruno; Cabinet Harle &amp; Phelip, 21, rue de la Rochefoucauld, F-75009 Paris (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i></p>
<p>(54) Title: USE OF GROWTH FACTOR PROTECTING POLYMERS FOR TREATING INFLAMMATION (54) Titre: UTILISATION DES POLYMERES PROTEGEANT DES FACTEURS DE CROISSANCE POUR LE TRAITEMENT DE L'INFLAMMATION (57) Abstract <p>The use of at least one polymer or biopolymer known as HBGFP, which is capable of specifically protecting growth factors of families FGF and beta-TGF from trypsin damage, and does not significantly inhibit coagulation, for preparing a drug for treating inflammation, is disclosed.</p><p>(57) Abrégé <p>Utilisation d'au moins un polymère ou un biopolymère, appelés HBGFP, protégeant spécifiquement les facteurs de croissance des familles des FGF et TGFβ de la dégradation trypsique et n'inhibant pas de manière significative la coagulation, pour la fabrication d'un médicament pour le traitement des inflammations.</p></p></p>		

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Caméroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

utilisation des polymères protégeant des facteurs de croissance pour le traitement de l'inflammation

La présente invention a pour objet  
5 l'utilisation de polymères ou de biopolymères pour la  
préparation d'un médicament pour le traitement de  
l'inflammation.

Elle est en outre relative a une composition  
contenant ces polymères et destinée à un tel  
10 traitement.

L'inflammation est une manifestation  
particulièrement complexe qui s'installe à la suite  
d'une lésion tissulaire spontanée ou traumatique.  
Caractérisée par une modification de la perméabilité  
15 capillaire, elle s'accompagne d'une infiltration de  
composants sanguins, moléculaires et cellulaires, qui  
se manifeste généralement par des érythèmes et des  
oedèmes. De nombreux médiateurs chimiques sont libérés  
ou activés pendant ce processus au cours duquel des  
20 éléments du sang, en particulier des globules blancs  
s'accumulent et relarguent différentes activités  
lytiques. De nombreuses substances sont employées  
comme agents anti-inflammatoires. Elles peuvent  
grossièrement être classées en agents stéroïdiens et  
25 non stéroïdiens.

Les facteurs de croissance appartenant à la  
famille des Heparin Binding Growth Factors (HBGF) sont  
naturellement relargués dans le cas d'une lésion ou  
d'un traumatisme tissulaire soit directement par ces  
30 tissus au niveau de leurs cellules constitutives , à  
partir des éléments de la matrice extracellulaire qui  
représente un site de stockage naturel de ces  
molécules, soit par les cellules circulantes et en  
particulier les cellules de l'inflammation. La

réaction inflammatoire s'accompagne d'une augmentation locale des concentrations en facteurs de croissance dont certains appartiennent à la famille des HBGF.

Le sucrose sulfate ester et son sel d'aluminium le sucralfate sont des produits décrits et utilisés  
5 comme agents anti-inflammatoires (Brevet US N°3,432,489) et dans différentes associations et compositions pharmaceutiques décrites dans une série de brevets (US 4.975.281, 4.885.281, US 5.013.557, US  
10 5.164.379, US 5.196.405, US 5.240.710 et DK 102.488 et DK 505.588).

D'autres composés ont été décrits comme des agents anti-inflammatoires: la suramine, composant organique sulphonaté par LAROCCA R et coll. (US  
15 7479817), des compositions contenant des mélanges de bas poids moléculaires de l'héparine par COHEN IR et coll. (WO9219249), des fragments d'héparine présentant des effets inhibiteurs du système du complément par EKRE H P et coll. (WO9202232), des produits dérivant  
20 par modifications chimiques de protéines glycosylées par MIYAZAKI K et coll. (EP454898), des protéoglycanes heparane sulfate comme le syndecan par BERNFIELD M et coll. (WO9305167), des oligosaccharides dérivés de dermatanes sulfates par BIANCHINI P et coll.  
25 (WO9305075).

Une composition contenant en association de l'héparine et du sulodexide, qui est un mélange de polymères comprenant des glycosaminoglycanes (GAG), a  
d'autre part été étudiée pour son action dans le  
30 traitement de traumatismes légers (Dragani et al., 1989, Minerva Medica, 80, n°4, 397-403). Néanmoins ces deux composés n'ont pas été testés séparément.

Il n'est donc pas possible de déterminer si

l'un de ces deux composés est responsable de l'activité thérapeutique.

5 L'activité d'un autre mélange de glycosaminoglycanes, le mésoglycan, sur les hémorroïdes a été testée par Saggioro et al., (1985, Min. Diet. e. Gastr, 31, 311-315). Il ressort de cette publication que le mésoglycan est très efficace à l'encontre des hémorroïdes et permet d'éliminer les symptômes tout en améliorant l'aspect endoscopique.

10 Néanmoins cette publication est limitée à des polymères d'un type bien particulier, qui de plus présentent une composition d'origine animale mal définie et sujette à des variations.

15 La synthèse d'une autre famille de polymères, appelés CMDBS (Carboxy Méthyl Dextrane Benzylamine Sulfonate) a été décrite dans le brevet FR 2 461 724 ainsi que dans le brevet US 4 740 594. Certains de ces polymères miment l'héparine et peuvent être utilisés en tant que produits de remplacement de l'héparine du plasma, grâce à leurs propriétés anticoagulante et anticomplément.

20 Parmi l'ensemble des polymères CMDBS, certains miment une autre propriété de l'héparine qui consiste en une stabilisation, protection et potentialisation in vitro de l'activité biologique des facteurs de croissance de la famille FGF . (Tardieu et coll , Journal of Cellular Physiology, 1992, 150 pages 194 à 203).

30 Le brevet FR 2 644.066 décrit l'utilisation de certains CMDBS associés aux FGF pour la cicatrisation de la peau et de la cornée. Des expériences ont été réalisées en provoquant une blessure cutanée à l'aide d'un emporte pièce de 6 mm de diamètre chez le rat.

Dans cet exemple, le CMDBS associé au FGF 2 permet d'obtenir un effet net sur la vitesse et la qualité de la réparation de la peau.

5 Il ressort donc de l'analyse de l'état de la technique que des polymères de type CMDBS ont déjà été utilisés en association avec des facteurs de croissance sur certaines lésions d'un type bien précis de tissu, le tissu cutané.

10 Du fait de l'imprévisibilité des effets thérapeutiques d'une molécule donnée, il n'était pas évident que ces polymères, seuls, et non associés à des facteurs de croissance, puissent avoir un effet sur d'autres tissus que ceux de la peau.

15 En effet, il est bien connu que les différents tissus du corps humain ou animal présentent des spécificités tant structurelles que fonctionnelles qui rendent impossible toute prédiction quant à l'effet de la molécule, connue pour son effet sur la cicatrisation du tissu cutané, sur des tissus de  
20 diverses origines soumis à une inflammation.

De même, il est bien connu qu'il est impossible de prédire l'activité in vivo d'une molécule sur un tissu particulier à partir de résultats obtenus in vitro sur un modèle expérimental  
25 spécifique.

De manière surprenante, il a été trouvé, selon l'invention, que certains polymères définis comme appartenant à la classe des HBGFPP et en particulier des CMDBS avaient un effet sur l'intensité de la  
30 réaction inflammatoire qu'ils diminuent de façon très marquée tout en accélérant les processus de réparation, de régénération et de restauration de tissus lésés. A une augmentation de la vitesse et de

la qualité de la cicatrisation des lésions des tissus du tractus digestif, des tissus cutanés, des tissus osseux, les HBGFPP associent des effets anti-inflammatoires.

5 Il a en outre été montré que des doses très faibles de ces polymères permettent d'obtenir des effets thérapeutiques.

La présente invention a pour objet une utilisation d'au moins un polymère ou d'un  
10 biopolymère, appelés HBGFPP, à l'exclusion du mésoglycan, protégeant spécifiquement les facteurs de croissance des familles des FGF et TGF bêta de la dégradation trypsique et n'inhibant pas de manière  
15 significative la coagulation, pour la fabrication d'un médicament pour le traitement des inflammations de divers tissus.

Un tel polymère présente particulièrement une activité anti-coagulante inférieure à 50 unités internationales par mg de polymère mesurée selon  
20 Maillet et al (Mol. Immunol, 1988, 25, 915-923). Avantageusement, il potentialise les FGF in vitro. Préférentiellement, il n'active substantiellement pas le système du complément, c'est-à-dire qu'il possède une activité anti-complément supérieure à 0,5 µg pour  
25 le CH50 (selon Mauzac et al., Biomaterials, 6, 61-63, 1985).

Selon la présente invention on entend par polymères toutes substances naturelles, naturelles  
30 modifiées chimiquement ou totalement synthétiques répondant à la définition donnée ci-dessus.

Ainsi il peut s'agir de :

- polymères obtenus à partir de dextrans mais modifiés par d'autres types de substitutions avec

d'autres types de radicaux,

- polymères naturels autres que ceux dérivant de dextrans mais comportant des résidus osidiques (cellulose, chitine, fucanes, etc...),

5       - polymères obtenus par polymérisation de monomères de natures non osidiques (poly acide malique, poly acide oxalique, poly acide lactique, polystyrène, polyéthylène glycol) modifiés ou non.

10       Avantageusement, ledit polymère ou biopolymère est un polysaccharide qui peut être composé principalement de résidus glucose.

Il peut aussi comprendre des résidus glucosamine et/ou d'acide uronique, particulièrement sous la forme de dimère glucosamine-acide uronique.

15       Des polysaccharides particulièrement préférés sont des dextrans substitués, des glycosaminoglycanes éventuellement associés à un lipide, un peptide ou un protide ou des sulfates de ces polymères.

20       Un tel polymère présente avantageusement un poids moléculaire d'au moins 10 kDa et préférentiellement d'environ 40 kDa.

La présente invention est en outre relative à une composition pharmaceutique contenant ces polymères.

25       Les polymères et/ou biopolymères peuvent être sélectionnés à partir de substances naturelles qui peuvent ensuite être éventuellement modifiées par additions de groupements chimiques appropriés, ou encore être obtenus entièrement par synthèse. Ces  
30       polymères naturels, semi synthétiques ou entièrement synthétiques sont ensuite sélectionnés sur la base de leurs capacités à interagir spécifiquement avec plusieurs facteurs de croissance notamment ceux de la



famille des FGF et des TGF bêta. Ils peuvent être également sélectionnés pour leurs capacité à protéger ce ou ces facteurs contre des dégradations protéolytiques, et à agir comme des inhibiteurs d'activités protéinasiqes impliquées dans le processus inflammatoire comme l'élastase leucocytaire, et la plasmine par exemple, et pour leur activité anti-coagulante. Ces polymères sont désignés sous le sigle générique de HBGFPP (heparin binding growth factor protectors and promoters). Deux prototypes de ces polymères ou bio polymères sont donnés comme exemples ainsi que les procédés et critères de sélection de ces polymères.

Le premier exemple de HBGFPP appartient à la famille des CMDBS qui sont des produits connus, à savoir des dextrans biospécifiques fonctionnalisés, substitués par des résidus carboxyméthyle, benzylamide et benzylamine sulfonate. Ces polymères illustrent l'obtention de HBGFPP à partir de produits naturels (dextrans) subséquemment chimiquement substitués. Le deuxième exemple décrit la sélection de produits complètement naturels comme les glycosaminoglycanes sulfates purifiés à partir d'extraits tissulaires.

Ces deux exemples illustrent les capacités de ces HBGFPP à d'interagir, à stabiliser, à protéger et à potentialiser les facteurs de croissances des familles FGF et TGF bêta et leur utilisation dans une composition pharmaceutique permettant le traitement d'inflammations de toutes origines.

Les différents exemples décrits dans cette invention montrent qu'en plus des effets cicatrisants propres des CMDBS sur différents types de régénération ou de cicatrisation tissulaire, l'intensité de la

réaction inflammatoire locale est très fortement diminuée.

On entend, dans la présente demande, par traitement toute opération curative ou préventive effectuée pour la prophylaxie ou la résorption d'inflammations faisant intervenir en particulier des activités protéinasiqes comme l'élastase leucocytaire, la plasmine, les métalloprotéinases en supplément d'effets stimulateurs de la régénération et de la cicatrisation tissulaire.

Les exemples ci-après illustrent une diminution de l'intensité de la réaction inflammatoire observée dans des tissus lésés traités par une fraction efficace de HBGFPP par exemple de CMDBS associé à un ou plusieurs véhicules compatibles et pharmaceutiquement acceptables avec le type de lésion. La composition pharmaceutique peut être également associée à des agents comme par exemple des antibactériens, des antifongiques, des vitamines ou analogues, des antiseptiques, des analgésiques, des agents protecteurs des rayonnements solaires et d'autres agents anti-inflammatoires ou tous autres types de composés associés pour leur effets spécifiques et administrée sous toute formes galéniques pharmaceutiques acceptables et compatibles avec le type de traitement envisagé.

Avantageusement, une telle composition est conçue pour être directement absorbée par voie orale, déposée sur la lésion ou injectée si celle ci est directement accessible notamment dans les lésions sous cutanées, buccales ou rectales ou encore lors des interventions chirurgicales en déposant ou injectant les tissus. La dose unitaire est de 10 à 2500 µg CMDBS

ou de HBGFPP par ml ou cm<sup>2</sup> de tissu à traiter sous un volume adapté à la spécificité de la pathologie. La dose de produit CMDBS ou HBGFPP utilisée correspond selon la surface de la plaie à une fraction d'une solution de départ de 10 à 2500 µg par millilitre (ce qui pour une application locale sur des plaies courantes implique une dépose rarement supérieure à quelques centaines de microlitres de la solution) cette dose étant appliquée une ou deux fois par 24 heures. Les compositions utilisées de sucralfate sont de 0.01 à 5% (selon le brevet US N° 5 196 405 ) soient des concentrations au moins 10 fois supérieures à celles décrites dans la présente invention et les effets décrits dans tous les exemples de ce brevet US N°5 196405 sont obtenus à partir de compositions 50 milligrammes par millilitre.

Le véhicule peut être du sérum physiologique ou des tampons tels que le PBS contenant NaCl 0.15 molaire ou toute autre sorte de solution compatible et non irritante pour le tissu lésé. Des formulations permettant d'obtenir des solutions pâteuses ou en gel ou en aérosol selon les techniques courantes connues de l'homme de l'art peuvent être proposées selon le type et l'accessibilité de la lésion.

Les domaines d'applications de ces composés correspondent sur un plan thérapeutique ou prophylactique aux pathologies associées aux activités de l'élastase et/ou de la plasmine.

Les principales pathologies associées à une activité de type élastase recouvrent les principaux domaines suivants :

- les lésions cutanées incluant les lèvres, la cavité buccale, la gencive (les maladies

parodontales), les muqueuses par exemple vaginale et les surfaces anales pour des éruptions superficielles inflammatoires, pruritiques, érythémateuse, l'acné ou les rosacées comme l'inflammation de type séborrhée ou pustulaire, les furoncles, les abcès;

- les infections bactériennes, fongiques, virales du revêtement cutané comme candida ou herpès,

- les dermatites à l'état aigu ou chronique en réponse à différents agents comme les coups de soleil ou brûlures superficielles,

- les réactions inflammatoires en réaction à des corps étrangers comme des pansements, des cathéters et les hémorroïdes;

- les vulvites ou prurits périanaux;

- les pathologies et désordres habituels de la sphère oto-rhino-laryngologique et pulmonaires comme les sinusites ou les rhinites allergiques, aiguës ou chroniques, les otites, les réactions inflammatoires pulmonaires, les oedèmes, les emphysèmes, les fibroses, des réactions secondaires à des bronchites, l'asthme;

- les pathologies oculaires en rapport avec des désordres de l'inflammation des produits de beauté allergisants, les conjonctivites, kératites ponctuées, les ulcères ;

- les maladies liées à des désordres immunologiques ou viraux comme les arthrites et la polyarthrite rhumatoïde, les synovites, la goutte et différentes formes d'inflammation arthritiques, le lupus érythémateux, l'anaphylaxie, les septicémies bactériennes, le SIDA;

- les maladies parasitaires comme la toxoplasmose, le cytomegalovirus, la malaria, la

polyomélyte, etc.;

- le traitement des réactions inflammatoires des organes comme les glomérulonéphrities par exemple pour le rein, ou celles associées à des procédures chirurgicales supposant ou non l'implantation de matériaux étrangers à l'organisme;

- les pathologies vasculaires avec notamment les anévrismes athéromateux ou celles liées au vieillissement comme celle de type artériocléromateux.

Les principales pathologies associées aux activités de type plasmine recouvrent en outre les domaines de la progression tumorale et des complications induites.

L'invention sera illustrée, sans être aucunement limitée par les exemples qui suivent, dans lesquels:

La figure 1 représente la formule du CMDBS.

La figure 2 illustre la potentialisation de l'activité biologique des FGF1 (2a) et FGF2 (2b) par l'héparine, le mésoglycan et le sulodexide. La mesure de l'activité biologique est effectuée sur des cellules CCL39 par la mesure de l'augmentation de l'incorporation de thymidine tritiée en fonction de la dose de FGF1 et de FGF2 ajoutée seule ou en présence de 20  $\mu$ g d'héparine, de 10  $\mu$ g de mésoglycan, ou de 10 $\mu$ g de sulodexide.

Les figures 3 et 4 illustrent l'effet protecteur de l'héparine, du mésoglycan et du sulodexide contre une dégradation thermique du FGF1(3) et FGF2 (4). Les échantillons de FGF sont incubés seuls ou en présence de 20  $\mu$ g d'héparine, de 10  $\mu$ g de mésoglycan ou de 10  $\mu$ g de sulodexide à 20°C (a) et 37°C (b) pendant 1, 7, 15, 30 jours. La mesure de

l'activité biologique présentée en abscisse correspond aux valeurs des unités de stimulation (ED50) de l'incorporation de thymidine tritiée dans des cellules CCL39.

5           La figure 5a illustre l'effet protecteur de l'héparine, du mésoglycan et du sulodexide contre une dégradation protéolytique du  $^{125}\text{I}$ -FGF1. La digestion protéolytique a été effectuée à 37°C et les échantillons ont été séparés par électrophorèse sur  
10   gel de polyacrylamide à 18%. Les gels sont séchés et autoradiographiés. La première piste contient le  $^{125}\text{I}$ -FGF1 seul, dans la deuxième (piste 2) le  $^{125}\text{I}$ -FGF1 est incubé en présence de trypsine et d'héparine (piste 3), de mesoglycan (piste 4) ou de sulodexide (piste  
15   5).

          La figure 5b illustre l'effet protecteur de l'héparine, du mésoglycan et du sulodexide contre une dégradation protéolytique du  $^{125}\text{I}$ -FGF2. La disposition des pistes est identique à celle présentée pour le  
20    $^{125}\text{I}$ -FGF1 en 5a.

          Les figures 6A et 6B sont des profils d'élution sur colonne de DEAE-Trisacryl respectivement des fractions HSM (Fig.6A) et HSS (Fig.6B), en présence de fractions chondroïtines sulfates (CSA) pour le  
25   calibrage de la colonne.

          Les figures 7A et 7B représentent respectivement des tissus osseux présentant une inflammation traitée par un pansement de collagène imbibé de sérum physiologique (7A), et le même  
30   pansement imbibé de CMDBS (7B).

          Les figures 8A à 8C d'une part et 8D à 8F d'autre part représentent respectivement des coupes de plaies cutanées traitées avec du collagène imbibé de

CMDBS et du collagène imbibé d'une solution physiologique.

La figure 9 illustre l'expression de métalloprotéinases à  $J = 5$  (pistes 1 à 11) et  $J = 6$  (pistes 12 à 17) dans des tissus sains (pistes 1 et 12), des  
5 tissus cicatriciels traités par le CMDBS (pistes 2 à 4 et 13 à 15), et des tissus cicatriciels traités par de la solution physiologique (pistes 5 à 11, 16 et 17).

10 EXEMPLE 1: Préparation et sélection des CMDBS

a) Préparation des CMDBS

Les CMDBS sont des dextrans substitués par des groupements carboxyméthyl, benzylamide et benzylamide sulfonate. La méthode de synthèse des CMDBS peut être  
15 celle décrite par M.MAUZAC et J.JOSEFONVICZ dans Biomaterials 1984,5,301-304.

Selon ce procédé, le carboxyl méthyle dextrane (CMD) est préparé à partir de dextrane par  
20 substitution de quelques unités glycosylées avec des groupes carboxyliques sur le carbone en position 5 ou 6.

Dans une deuxième étape, la benzylamide est couplée aux groupes carboxyliques pour former le carboxyméthyl-benzylamide dextrane (ou CMBD). Enfin  
25 quelques noyaux aromatiques du benzylamide sont sulfonés pour aboutir au carboxyméthyle dextrane benzylamide sulfonate ou CMDBS.

Les sels de sodium de ces dérivés sont ultrafiltrés, lyophilisés et dissous dans le tampon  
30 approprié avant utilisation.

La formule générale des CMDBS est représentée sur la figure 1.

Les CMDBS possèdent une distribution

statistique des différents substituants. Les pourcentages pour chaque type de CMDBS sont déterminés par les méthodes classiques.

b) Sélection des CMDBS

5 i: Tests de protection et de stabilisation des FGFs

Lors de la synthèse des CMDBS il est possible de contrôler le taux de substitution de chacun des groupements par modification des conditions de la réaction de substitution. Le contrôle des paramètres  
10 comme la température, le temps de réaction, les concentrations relatives des constituants et le nombre de réaction de substitution etc.. permettent d'obtenir un très grand nombre de polymères substitués. La substitution des hydroxyles par le carboxyméthyl sur  
15 les carbones en position 5 et 6 permet d'obtenir des taux de carboxyméthylation allant de 0 à 200% (100% pour chacun des carbones en position 5 et 6). Le groupement carboxyméthyl peut être à son tour partiellement ou totalement utilisé pour la fixation  
20 de la benzylamide. Les groupes benzylamides peuvent être partiellement ou totalement utilisés pour la sulfonation. Les dextrans substitués fonctionnalisés utilisés selon l'invention sont parmi ceux spécialement décrits dans le brevet français  
25 n°2.461.724. Outre la capacité à stabiliser et protéger les facteurs de croissance de la famille FGF comme décrit dans la publication de Tardieu et coll J.Cell.Physio.1992 150 p 194 à 203 ; et dans le brevet Français N°2.461.724; le CMDBS sélectionné doit  
30 pouvoir interagir avec au moins un membre de la famille des facteurs de croissance de la famille TGF bêta selon une méthode d'évaluation décrite ci-dessous et protéger les TGF bêta contre une protéolyse.



ii: Evaluation des capacités d'interactions entre CMDBS et les facteurs de croissance de la famille TGF bêta.

5 Afin de mesurer la capacité de certains CMDBS à interagir avec les membres de la famille TGF bêta et de par cette interaction protéger les TGF bêta, un test de criblage a été établi. Ce test consiste à mesurer la capacité du CMDBS sélectionné à permettre au TGF bêta de garder son activité biologique malgré  
10 un traitement protéasique.

Dans l'exemple ci dessous le CMDBS utilisé est le lot 26.2 défini par un taux de substitution de 110% de motifs carboxyméthyles, 3,6% de motifs benzylamides et 36,5% de motifs sulfonates et possède une activité  
15 anti coagulante de 4 UI/mg (Unités Internationales). L'activité anti-complément de ce lot est de 1,1  $\mu$ g de CH50, mesurée selon Mauzac et al (précédemment cités).

L'héparine utilisée comme témoin provient des établissements Sanofi.(Institut Choay) et présente une  
20 activité anticoagulante de 175 UI/mg

Le TFG bêta 1 est préparé à partir de plaquettes sanguines humaines selon le protocole décrit dans de nombreuses publications et couramment utilisés par l'homme de l'art, par exemple dans la  
25 publication Growth Factors and their Receptors 1992 , vol. 1 PP 419-472 par A. Roberts et M.Sporn édité par A. Roberts et M.Sporn et publiée par Springer Verlag Berlin. Le test d'activité biologique du TGF bêta utilisé dans cet exemple est celui de l'inhibition de  
30 croissance des cellules CCL64 (provenant de l'American Tissue Culture Collection). Cette inhibition est mesurée par la capacité du TGF b à inhiber l'incorporation de Thymidine tritiée d'une manière

dose dépendante dans ces cellules CCL64 stimulées par le facteur de croissance FGF ou par du sérum de veau foetal selon le protocole décrit par Van Zolen dans Progress in Growth Factor Research, 1990 ,2 p. 131 à 152. Le TGF bêta est utilisé à deux doses, l'une correspondant à la capacité d'inhibition de 50% de l'incorporation de Thymidine tritiée (définie comme l'unité d'activité inhibitrice) l'autre, correspondant à la capacité d'inhibition de 100%. Dans cet exemple les valeurs obtenues sont de 250 pg de TGF bêta pour obtenir l'unité d'activité d'inhibition sur les cellules CCL64 cultivées dans 1 ml de milieu de culture. Le 100% d'inhibition est obtenu avec 1ng de TGF bêta dans 1 ml de milieu de culture.

Un échantillon de 50ng de TGF bêta dans du tampon phosphate salin contenant 0.1% de serum albumine bovine (provenant de la société SIGMA à Saint Louis USA) est incubé seul, ou associé soit à 5000 ug de CMDBS, soit à 5000 µg d'héparine, avec ou sans 500 µg de trypsine. Le volume final de la solution incubée est ajusté à 1 ml et l'incubation est effectuée à 37°C durant un temps variable (10 minutes dans l'exemple décrit tableau 1).

Des échantillons d'un volume de 20 µl de chacune des réactions d'incubation sont prélevés et ajoutés aux cellules CCL64 cultivées dans des plateaux de 24 puits contenant chacun un millilitre de milieu de culture selon le protocole décrit par E.Zohlen mentionné ci dessus. Dans ces conditions la concentration finale de TGF bêta par puits est de 1ng/ml. La tableau 1 résume les résultats obtenus dans diverses conditions et montre l'effet protecteur du CMDBS. Ainsi après 10 mn d'incubation à 37°C, 75% de

l'activité biologique du TGF bêta est encore présente, alors que l'héparine qui pourtant peut se fixer au TGF bêta (Mac Caffrey et al., J. of Cell Physiology, 1992, vol.52, 430-440) ne protège pas le TGF bêta contre  
5 cette dégradation protéolytique (il reste moins de 20% d'activité biologique). Il est à rappeler que dans le cas des FGFs l'héparine assure une protection contre la protéolyse induite par la trypsine. (Tardieu et al., Journal of Cellular Physiology, 1992, 150: 194-203).

10 Il a été vérifié que le CMDBS n'avait pas de pouvoir inhibiteur sur l'activité de la trypsine (tableAU 2). Ainsi, 10 µg de trypsine ont été incubés soit avec un substrat (S.87 fourni par la société  
15 Serbio, Paris et utilisé selon les recommandations de ce fournisseur) ou soit avec ce substrat et un inhibiteur de la trypsine tel celui provenant du soja (comme le Soyabean trypsin inhibitor ou STI de chez Sigma) ces incubations étant faites en l'absence ou en présence de quantités variables de CMDBS (lot AM26).  
20 L'activité enzymatique de la trypsine a été mesurée par absorption spectrophotométrique du produit de transformation du S 87 en fonction du temps d'incubation.

Exemple 2: Sélection d'autres HBGFPP :

25 Une préparation commerciale de protéoglycosa-minoglycane et glycosaminoglycanes, le sulodexide a été sélectionnée selon sa capacité à interagir avec les facteurs de croissance de la famille des FGF ainsi qu'avec ceux de la famille des TGF bêta.

30 Des préparations d'héparane sulfate obtenues par fractionnement du mésoglycan et du sulodexide ont d'autre part été testées.

Le mésoglycan et le sulodexide ont été fournis

par la Société Sigma Chemical Co , Saint Louis MO USA.  
Leurs propriétés sont résumées dans le tableau 3.

Les cellules utilisées dans cet exemple sont  
les cellules CCL39 qui proviennent de l'American  
5 Tissue Culture Collection. Les conditions de culture  
et de tests de mesure d'activité biologique des FGFs  
sont les mêmes que celles décrites dans la publication  
Tardieu et coll J.Cell.Physiol. 1992. Les facteurs de  
croissance FGF utilisés sont les formes recombinantes  
10 FGF1 et FGF 2.

a) Effet du sulodexide sur l'activité biologique des  
FGFs in vitro.

Dans ces expériences le FGF1 ou 2 est utilisé à  
une dose correspondant à la dose efficace (notée ED50)  
15 pour induire une stimulation de l'activité biologique  
de 50% de la dose induisant la stimulation maximale.  
L'activité biologique est mesurée par la capacité  
d'induire une augmentation de l'incorporation de  
thymidine tritiée dans les cellules selon les  
20 protocoles largement décrits dans de nombreuses  
publications dont celle de Tardieu et coll mentionnée  
précédemment et également dans le brevet français N°2  
644 066.

Dans cet exemple l'ED50 est de 5 ng/ml pour le  
25 FGF1 et de 3 ng/ml pour le FGF 2, valeurs mesurées  
expérimentalement (Figs.2a et 2b). La même expérience  
de stimulation en fonction de la dose de FGF est  
effectuée en présence de 10 µg/ml de Sulodexide ou 20  
ug/ml d'Héparine. La figure 2 montre que dans ces  
30 conditions l'ED50 devient 0.4 ng/ml et 0.2 ng/ml  
respectivement pour les FGF1 et FGF2 en présence de  
ces doses de Sulodexide ou d'Héparine. Outre cette  
capacité à potentialiser l'activité biologique des

FGFs les HBGFPP protègent les FGFs contre les dégradations thermiques ainsi que contre l'inactivation induite par l'action protéolytique de la trypsine. (Figs. 4 et 5). De la même manière ces HBGFPP protègent FGF1 et 2 contre une inactivation induite par l'activité protéolytique de la trypsine (Figs. 5a et 5b).

b) Effets protecteurs du sulodexine, du dextrane, du dextrane sulfate et de la sucrase vis-à-vis des TGFbêta.

Plusieurs autres composés ont été évalués : le dextrane sulfate (Sigma Chemical, de poids moléculaire 40.000, le dextrane ayant servi à la synthèse du CMDBS (également de chez Sigma) de la sucrase ou sucrose octasulfate (fournie par D. Bar Shalom, Société BUKH MEDIC, au Danemark). Certains de ces composés ont été choisis car ils protègent et stabilisent les FGF tels que la sucrase se confère au brevet US N° 5202311 ou le dextrane sulfate se confère au brevet japonais n° 138 907/88). Le dextrane est celui qui a servi à la synthèse du CMDBS AM26.

L'expérience de protection de l'activité biologique des TGFbêta a été réalisée de la même manière qu'avec les CMDBS ainsi que décrit dans l'exemple 1 ii. Le mélange d'incubation contient 50 ng de TGF bêta (dans 0.1 % d'albumine sérique de bovin) et de la trypsine (500 µg). Le Mésoglycan ou le Sulodexide ou le dextran sulfate ou le dextran ou la sucrase sont utilisés à la dose de 5000 µg.

L'activité biologique du TGFbêta est mesurée comme décrit ci-dessus après une dilution de 50 fois et en utilisant des cellules CCL64.

Les résultats sont présentés dans le tableau 4.

Ces résultats illustrent que, comme certains CMDBS capables de répondre aux deux critères de sélection vis-à-vis des FGF et TGFbêta, le sulodexide présente une activité protectrice significative pour les TGFbêta.

c) Isolement de la fraction Héparane Sulfate du Sulodexide et du Mésoglycan

Le Sulodexide et le Mésoglycan correspondent à des mélanges de plusieurs substances dont l'essentiel est constitué de différents glycosaminoglycanes (GAG).

Par une première étape de purification, il a été établi qu'un gramme de produit sec de chacun de ces deux produits contenait respectivement 874 mg pour le mésoglycan et 795 mg pour le sulodexide de GAG totaux.

Cette purification a été obtenue en soumettant ces produits solubilisés à une chromatographie échangeuse d'ions (DEAE - Trisacryl) pour enlever tous les contaminants protéiques. Les GAG totaux ont alors été purifiés en éluant le gel de DEAE avec une solution d'acétate de sodium, pH 4, contenant 1,5 M NaCl.

Après une phase de dialyse extensive contre de l'eau, 60 mg de chaque produit de GAG ont été digérés par la chondroïtinase ABC pendant une nuit à 37°C ( 1 unité par mg de GAG). Cette enzyme dégrade tous les GAG à l'exclusion des héparanes sulfates (HS). Les produits de digestion ont été soumis à une chromatographie sur tamis moléculaire (G50 Sephadex, colonne de 1,8 x 95 cm). L'élution est ensuite réalisée en tampon bicarbonate d'ammonium sous un débit de 18 ml/h. Le matériel non digéré qui correspond à des GAG de nature HS est collecté dans le

volume mort d'élution de la colonne.

Les concentrations en GAG sont calculées à partir de leur contenu en acide uronique par la méthode au carbazole (Bitter T. et Muir H.M., 1962, Anal. Biochem 4, 330-334).

Ces dosages ont permis de préciser la composition suivante de chacun des produits:

	Sulodexide	Mésoglycan
GAG totaux	79 %	87 %
10 Fraction Héparane Sulfate (HS)	48 %	52 %
Autres GAG	31 %	35 %

Les fractions HS de chacun de ces deux produits ont été chromatographiées à nouveau sur un gel de DEAE Trisacryl. 1 mg de chaque fraction HS, purifiée à partir du mésoglycan (Fig. 6A) ou du sulodexide (Fig. 6B), dans 3 ml a été déposé sur une colonne équilibrée avec du tampon 0,05 M NaCl, 0,05 M TMS-Hel pH 7,5. Après un lavage de la colonne par 10 volumes du même tampon suivi d'un lavage par 10 volumes d'un tampon 0,05 M NaCl, 0,05 M d'acétate de sodium pH 4, le matériel fixé à la colonne est désorbé par un gradient salin allant de 0,05 M NaCl à 1,5 M NaCl dans le même tampon acétate. 1 ml de chaque fraction collectée a été dosé par la méthode au carbazole.

Le matériel correspondant aux constituants HS de chacun des produits d'origine présente approximativement le même profil d'élution et donc à peu près la même charge apparente. Ce maximum du pic d'élution est obtenu pour une concentration saline de 0,94 M NaCl. Une fraction définie de chondroïtine sulfate (CSA) a été soumise au même protocole en vue de calibrer la chromatographie. Cette fraction CSA qui ne contient qu'un groupe sulfate par disaccharide est

élué à la force ionique de 0,72 M NaCl.

Ces résultats montrent que la fraction HS contient plus de groupements sulfates que les CSA de référence. La fraction HS présente environ deux  
5 groupes sulfates par unité dissacharidique.

Ces fractions ont été testées pour connaître leur pouvoir protecteur vis-à-vis du TGF  $\beta$  et du FGF en comparaison des pouvoirs établis avec les produits bruts respectifs.

10 Evaluation semi-quantitative des effets protecteurs du FGF par différents polymères.

Comme décrit ci-dessus, une quantité constante de FGF radioactif est incubée dans des conditions différentes. Après autoradiographie des produits de la  
15 réaction, la quantité de FGF radioactif non dégradé est quantifiée par densitométrie. Les valeurs correspondent au pourcentage de FGF radiomarké retrouvé par rapport à la quantité déposée en début de réaction. (Tableau 5).

20 Les résultats des tableaux 4 et 5 montrent que les fractions HSM et HSS issues respectivement du mésoglycan et du sulodexide présentent des effets protecteurs supérieurs à ces deux compositions et proches de 100%.

25 EXEMPLE 3: Effets inhibiteurs in vitro des CMDBS et des glycosaminoglycanes sur l'activité de l'élastase leucocytaire et sur la plasmine.

Les pouvoirs d'inhibition de différents CMDBS et de leurs composés intermédiaires de leur synthèse,  
30 ont été établis pour l'élastase leucocytaire et la plasmine.

L'élastase leucocytaire purifiée a été obtenue par Elastin Products Co (Owenville, MO, USA) et la



plasmine chez SIGMA.

L'inhibition des activités enzymatiques par ces différents composés est effectuée à 37°C dans un bain thermostaté. Les enzymes considérées sont mises en solution dans un tampon Tris-HCL 100 mM, pH8 pour l'élastase et pH 7,4 pour la plasmine, en présence de 0,02% d'azide de sodium et de 0,01% Triton X100 pour la plasmine. Les concentrations des substrats et celles des enzymes sont : 0,10 mM MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNA (paranitroanilide) pour l'élastase à 8,3 nM et 0,20 mM dVal-Leu-dLys-pNA pour la plasmine à 77 nM. Pour chacune des conditions est établi l'IC50.

Le tableau 6 donne les résultats obtenus dans lesquels, le lot AM6 correspond à un dextrane T40 de 40 000 kD. Le lot EM5 correspond à un dextrane T10 de 10 000 kD. Les produits intermédiaires de synthèse sont répertoriés d'après les sigles désignés ci-dessus indexés d'un numéro qui précise le nombre de chacune des réactions de substitution.

Les valeurs des IC50 démontrent que les CMDBS ont des effets inhibiteurs de type hyperbolique non compétitif sur l'activité de l'élastase leucocytaire comparables à ceux de l'héparine, l'un des meilleurs inhibiteurs de cette activité (Ki de l'ordre de 1 nM). Les CMDBS exercent de plus et à l'inverse de l'héparine des effets inhibiteurs sur la plasmine.

Il ressort en outre du tableau 6 que les effets inhibiteurs des fractions HSM et HSS sont supérieurs à ceux du mésoglycan et du sulodexide, respectivement.

#### EXEMPLE 4: Effet anti-inflammatoire des CMDBS dans le tissu osseux.

Afin d'étudier l'effet anti-inflammatoire des CMDBS dans le tissu osseux on a utilisé un modèle de

5 régénération de l'os calvaria chez le lapin. Après avoir effectué une découpe de cet os dans sa demi épaisseur on a comparé la réaction inflammatoire dans le tissu de granulation en présence ou en absence de CMDBS.

Des lapins adultes blancs de la race New Zealand ayant fini leur croissance osseuse et pesant 3 à 4 kg sont répartis en 2 groupes de 8 lapins des deux sexes. Ces lapins ont été anesthésiés par 10 injection intrapéritonéale d'hydrochloride kétamine (100 mg/kg) et d'acépromazine (100 mg/kg). Une incision paramédiane fronto-pariétale a été réalisée pour accéder à la calvaria. Quatre défauts osseux de 5 mm de diamètres et 3 mm de profondeur ont été réalisés 15 à l'aide d'une fraise. Durant l'intervention, le côté opéré a été constamment irrigué pour éviter des accidents thermiques. Les deux régions céphaliques n'ont pas été comblées et de ce fait, servent de contrôle alors que les côtés postérieurs gauche et 20 droit sont comblés avec du collagène (collagène hémostatique microfilaire (Pangen) provenant des laboratoires Fournier Dijon, France) ou du collagène imprégné la nuit dans une solution de CMDBS à 100 µg/ml. Une hémostase appropriée a été réalisée avant 25 de procéder à la suture de la plaie. Les plaies sont refermées avec du fil en nylon de suture et le côté opéré est recouvert d'un pansement stérile. Les animaux ont été laissés en convalescence et aucune complication post-opératoire n'a été constatée. Les 30 animaux ont été euthanasiés aux jours 3, 4, 8 et durant les 12 semaines qui ont suivi l'intervention. Tous les animaux ont reçu un traitement identique et ont servi pour leur propre contrôle. Après examen

macroscopique du site de l'opération, les crânes sont décalcifiés et inclus dans de la paraffine. Le côté opéré a été étudié au microscope pour être mis en culture. Après que les modèles soient décalcifiés et posés dans de la paraffine, des sections sagittales (5 mm d'épaisseur) des zones correspondants aux défauts ainsi créés ont été découpées à l'aide d'un microtome et colorées à l'hématoxylin et à l'éosine. Ces coupes sont étudiées au microscope et les défauts ont été 100 fois grossis, en utilisant une grille de 2,5 x 2.5 mm normalisée par 10 divisions de 0,25 mm de chaque côté. Ces mesures ont été ensuite rapportées sur un graphique pour comparer les résultats suivant les différents groupes traités.

Dans ce travail, on a utilisé le CMDBS ,lot AM26, dont le contenu en acide méthylcarboxylique est de 110 %, celui en benzylamide de 2,5 % et en benzylamide sulfoné de 36,5% . L'activité anticoagulante spécifique de ce CMDBS est 4 IU/mg comparé à l'héparine standard (échantillon n°108, Sanofi-Choay Recherches, Gentilly, France) qui a une activité anticoagulante de 173 IU/mg.

Les figures 7A et 7B montrent la différence de la réaction inflammatoire observée après 3 semaines dans le tissu de granulation correspondant au comblement du défaut osseux réalisé expérimentalement.

Dans la figure 7A qui correspond au pansement de collagène imbibé uniquement de sérum physiologique, la réaction inflammatoire est très forte; le tissu de granulation contient un grand nombre de cellules inflammatoires et peu de cellules ostéoblastiques .

Par contre, le même traitement avec un collagène imbibé de la solution de CMDBS a fait

régresser très nettement cette réaction inflammatoire, favorisant la réparation du défaut osseux et démontrant ainsi l'effet antiinflammatoire du CMDBS.

EXEMPLE 5 : Effet anti-inflammatoire du CMDBS sur la muqueuse gastrique.

Principe

L'administration par voie orale d'1 ml d'éthanol absolu chez le rat provoque dans l'heure qui suit l'apparition de lésions hémorragiques de la muqueuse gastrique.

Méthodes

Des groupes de 6 rats mâles Sprague Dawley, d'environ 200g, sont mis en jeûne hydrique 24H avant l'essai. Le jour du test, 1 ml est administré par voie orale et les animaux sont sacrifiés 1 h 30 après. L'estomac est prélevé, ouvert selon la grande courbure et rincé.

L'atteinte de la muqueuse est cotée selon le barème suivant.

0: muqueuse normale

1: petites stries roses hémorragiques superficielles

2: stries hémorragiques superficielles rouges, courtes et larges

4: stries hémorragiques superficielles rouges-noires, longues et larges

5: perforation

Traitement:

Le CMDBS a été dissous dans l'eau distillée, la PGE2 dans l'éthanol à 10% puis dilué dans le soluté physiologique. Les traitements sont effectués par voie orale, 1 heure avant l'éthanol et 45 mn après sous un volume de 5ml/kg.

Expression des résultats

Pour chaque lot d'animaux, les valeurs moyennes +/- e.s.m. des scores d'altération ont été calculées. Elles sont présentées dans le tableau 7. La comparaison statistique est effectuée à l'aide du test non paramétrique de White, par rapport au groupe témoin avec une différence significative notée  $p \leq 0,01$ .

#### Résultats

Comme l'illustrent ces résultats, l'administration d'éthanol absolu induit chez la majorité des animaux l'apparition de larges stries hémorragiques confluentes. Chez les animaux témoins le score d'altération est de  $3,75 \pm 0,17$ .

Le CMDBS administré per os à la dose de  $100 \mu\text{g/kg}$  (2 fois par jour) réduit en 24 heures de 56% ( $p > 0,01$ ) la gravité des lésions. Aux doses supérieures l'activité cytoprotectrice n'est pas retrouvée. Le CMDBS exerce des effets comparables à la prostaglandine E2 considérée comme un agent protecteur de la muqueuse gastrique contre des agents topiques irritants qui induisent une réaction inflammatoire intense locale (réduction de 63% des lésions).

EXEMPLE 6 : Effet anti-inflammatoire sur des colites induites par le TNB chez le rat.

#### Principe:

L'administration intrarectale d'acide trinitrobenzène sulfonique (TNB) entraîne chez le rat l'apparition d'un colite chronique, associée à de graves lésions de la muqueuse produites par une réaction inflammatoire aiguë avec libération de médiateurs (PAF, interleukines, éicosanoïdes), et accompagnée d'un oedème important quantifiable au Bleu

d'Evans.

Méthodes.

Des groupes de 6 rats mâles Sprague Dawley, d'environ 200g, sont mis en jeûne hydrique 24 heures avant l'essai. Le jour du test, les animaux sont anesthésiés au pentobarbital (30 mg/kg) par voie intraperitonéale. 20 mg de TNB dissous dans 0,25 ml d'éthanol à 50% sont instillés dans le colon à 6 cm de l'anus. Les animaux sont remis dans leur cage après le réveil avec nourriture et boisson à volonté.

4 jours plus tard, les animaux sont sacrifiés et le colon est prélevé. 30 mn avant le sacrifice, 1 ml de Bleu Evans est administré par voie veineuse pour évaluer l'oedème accompagnant la colite selon le protocole suivant: Le colon est mis dans un tube contenant 9 ml de formamide. Après centrifugation, le surnageant est prélevé et un dosage spectrométrique est effectué à 620nm de longueur d'ondes.

Traitement:

Le CMDBS a été dissous dans la carboxyméthylcellulose à 0,5%. Les traitements ont été effectués par voie intrarectale sous un volume de 1 ml/kg, 4 heures avant le TNB 1 fois par jour jusqu'au sacrifice de l'animal.

Résultats

Pour chaque lot d'animaux, les valeurs moyennes +/- e.s.m. des scores d'altération ont été calculées. Elles sont présentées dans le tableau 8. La comparaison statistique est effectuée à l'aide du test "t" de variance par rapport au groupe témoin avec une différence significative notée  $p \leq 0,05$ .

Dans cet exemple, le CMDBS a un effet anti-inflammatoire comme le montre le dénombrement des

cellules inflammatoires révélées par coloration au bleu d'Evans. 300 µg de CMDBS par kg réduisent de moitié cette coloration ( $p \leq 0,05$ ).

EXEMPLE 7 : Effet sur l'inflammation cutanée chez le rat.

A. Animaux

Les expérimentations ont été effectuées sur des rats mâles Hairless OFA-hr/hr Ico, EOPS, exempts d'organismes pathogènes spécifiques, âgés.ia.EOPS (Exempts d'organismes pathogènes spécifiques); de 9 à 10 semaines (250-300 gr) (IFFA CREDO, France). Ces rats se caractérisent par un système pileux très peu développé dû à un gène récessif hr, défini par le terme "Hairless". Dès réception, les rats sont stabulés et hébergés selon les directives de la Communauté Economique Européenne, décret d'Avril 1986; n° 86/609/CEE.

B. Mode opératoire

Les rats sont anesthésiés par injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (0.1 ml/100 g pour les rats sains et 0.05 ml/100 g pour les rats diabétiques). Trois défauts cutanés dermo-épidermiques sont pratiqués de part et d'autre de la colonne vertébrale à l'aide d'un emporte pièce de 6 mm de diamètre. Des compresses de collagène bovin inactivé (PANGEN, Fournier) sont découpées à l'emporte pièce, imbibées de la solution à tester ou d'une solution de PBS.ia.PBS; pendant 2 heures à température ambiante avant d'être déposées dans chaque plaie. L'ensemble est alors recouvert d'un pansement occlusif (OPSITE) gardant le collagène hydraté, puis d'un élastoplaste empêchant le rat de se débarrasser de son pansement. Les rats sont placés dans des cages individuelles avec

eau et nourriture à volonté. Chaque condition expérimentale regroupe des lots de 6 à 10 animaux. Le processus cicatriciel est considéré à des temps variables exprimés en jours (Jx) après la date de l'opération (J0).

#### C. Traitement des plaies

Les plaies des rats sains sont traitées avec des pansements de collagène imbibés d'une solution physiologiques contenant ou non du CMDBS-AM6 à 50 µg/ml.

#### D. Prélèvements des plaies

Les lots d'animaux témoins (sans CMDBS) ou traités (avec CMDBS) sont sacrifiés par injection d'un excès de pentobarbital sodique. Les contours de la plaie sont reportés sur un calque, puis la plaie est prélevée à l'aide du même emporte-pièce de la même dimension que celui utilisé à J0 et conservée à -80°C. Pour l'étude histologique, les pièces sont prélevées en prévoyant un excès de 5 mm de peau non lésée autour des contours d'origine puis placées dans un fixateur dont la composition varie en fonction de l'étude envisagée.

#### E. Etude histologique

Les prélèvements de tissus sont placés pendant 24 à 48 heures dans un excès de fixateur (paraformaldéhyde 4%, glutaraldéhyde 0.1%, saccharose 5%, PBS 100mM, pH7) puis déshydratés progressivement avant d'être inclus dans du Paraplast Plus (Prolabo). Des coupes de 5 mm sont réalisées avec un microtome à paraffine (Reichert-Yung) et colorées au trichrome de Masson (GABE, 1988).

Les résultats des observations histologiques sont présentés sur les figures 8A à 8F qui rapportent



cette étude histologique de la cicatrisation cutanée à J6 post-opératoire, (coloration des coupes au Trichrome de Masson).

Les figures 8A à 8C présentent les plaies  
5 traitées avec du CMDBS (50 µg/ml) et les figures 8D à 8F représentent les plaies traitées avec le véhicule seul. Ces figures montrent une inégalité dans la qualité du tissu de granulation. Il existe un aspect plus mature de la cicatrice (Fig.8A, x4) par rapport  
10 au témoin (Fig.8D, x4). Un agrandissement (x25) de la région épidermique montre une reconstitution de celle-ci dans les deux cas (Fig.8B et 8E x25).

La différence réside dans la maturation du tissu de granulation : la plaie traitée (Fig.8C x25)  
15 avec du CMDBS montre la présence de fibroblastes (flèche) qui commence à s'orienter et qui produisent une matrice en quantité plus importante que dans la plaie témoin. Les cellules inflammatoires dans les plaies traitées avec du CMDBS sont en nombre restreint par rapport au témoin (Fig.8F x25) qui montre la  
20 persistance de phénomènes inflammatoires importants.

EXEMPLE 8 : Mise en évidence des activités métallo-protéïnases matricielles extraits des tissus cutanés en cours de cicatrisation.

25 Des prélèvements de tissu cutané sont effectués selon le même protocole et les mêmes conditions expérimentales que ceux présentés dans l'exemple précédent.

Traitement des plaies

30 Les plaies des rats sains sont traitées avec des pansements de collagène imbibés d'une solution physiologique contenant ou non du CMDBS-AM6 à 50 µg/ml.

Les métalloprotéinases matricielles (MMPs) et, plus particulièrement les collagénases 92 kD (collagénase de type V) et 72 kD (collagénase de type IV), sont mises en évidence grâce à la technique du zymogramme.

La peau prélevée à J0 est nommée contrôle (C). Le prélèvement effectué au jour x (Jx) au même emplacement selon les contours d'origine est nommé plaie (P). C et P sont toujours traités en même temps et selon le même protocole.

Chaque prélèvement est pulvérisé une minute dans un broyeur à azote liquide (Bioblock). La poudre est pesée et mélangée dans un tampon 100 mM phosphate pH7.4; 1M NaCl (1ml pour 100 mg de poudre). L'ensemble est homogénéisé à l'Ultra-turax pendant 30 secondes, laissé 1 heure à 4°C puis centrifugé à 43700g (Beckman J2-21) à 4°C pendant 30 minutes. Le volume du surnageant est mesuré puis aliquoté avant d'être conservé à -80°C. Le culot, pesé, est conservé à -80°C.

Les extraits obtenus à partir de broyats de peau cicatricielle ou non (25 mg de protéines en tampon non réducteur, non chauffés), sont déposés sur des gels de polyacrylamide 10% contenant 1 mg/ml de gélatine (Sigma, ref G2500). Après migration en tampon de Laemmli, les protéines déposées sur gels sont renaturées avec une solution de Tris-HCl 100 mM, pH 7.4 contenant 2.5% de triton x100 (2 fois 30 minutes). Le Triton est éliminé par deux lavages en tampon Tris-HCl 100 mM. Les gels d'électrophorèse sont incubés à 37°C durant 48 heures dans un tampon Tris-HCl 100 mM contenant 10 mM de CaCl<sub>2</sub>, 0.001% NaN<sub>3</sub>, 0.0015% Brij 35, 1 mM ZnCl<sub>2</sub>. Après avoir éliminé soigneusement le tampon d'incubation, les gels sont colorés durant 20

minutes sous agitation avec une solution de Bleue de Coomassie R250 (5mg/ml) contenant de l'acide acétique (10%), du propanol-2 (30%), puis décolorés (acide acétique 10%, méthanol 40%), jusqu'à visualisation des bandes. Les gels sont photographiés. Afin de s'assurer que les différentes bandes de digestion obtenues sont bien dues à des MMPs, les échantillons sont incubés en présence d'inhibiteurs spécifiques; Phényl méthyl sulfonyl fluoride ou PMSF (2 mM final) inhibiteur des sérines endopeptidases, l'acide éthylène diamine tétracétique ou EDTA (20 mM final) inhibiteur des métallo-endopeptidases, le N-éthyl maléimide ou NEM (2 mM final).

La figure 9 montre l'expression des Métallo-Protéinases Matricielles détectées dans les extraits de plaies en fonction du traitement ou non par le CMDBS et en fonction du temps de la cicatrisation.

25 mg de protéines obtenues à partir des extraits de broyats de peau saine ou de peau cicatricielle à J5 et J6 post-opératoires sont déposés sur un gel de polyacrylamide 10% contenant comme substrat 1 mg/ml de gélatine. Les pistes 1,12 représentent la peau saine qui sert de témoin interne de migration. Les pistes 2, 3, 4 et 13, 14, 15 représentent les extraits obtenus à partir de cicatrices traitées avec du CMDBS à raison de 50 mg/ml (6 rats différents). Les pistes 5 à 11 et 16, 17 représentent les témoins correspondants. Chaque piste représente un rat différent.

Deux types de collagénases sont retrouvés dans la peau saine : La forme de 72 kDa et sa forme activée la 68 kDa. Par contre, à J5 et J6, dans les plaies traitées ou non avec le CMDBS, la 92 kDa est présente

de manière identique. La différence réside dans les niveaux d'expression de la 72 kDa et de sa forme activée, la 68 kDa. A J5, dans les plaies témoins la 72 kDa et la 68 kDa sont exprimées de manière très importante par rapport aux plaies traitées avec du CMDBS. De plus, il y a apparition d'espèces de bas poids moléculaires qui n'existent pas dans les plaies traitées avec le CMDBS. A J6, cette différence se confirme puisque pour le même dépôt protéique qu'à J5, l'activité des collagénases est telle que les pistes 16 et 17 apparaissent sous forme de deux traces blanches. Cette activité qui n'existe pas chez les rats traités au CMDBS.

Les CMDBS modulent donc les niveaux d'expression des MMPs soit directement soit indirectement à travers leur rôle inhibiteur sur la plasmine qui est un de leurs activateurs.

**TABLEAU 1**  
Effets protecteurs du CMDBS et de l'héparine  
à l'encontre de la dégradation du TGFbêta par la  
trypsine

mélange d'incubation à 37°C pendant 10min et contenant par milliliter selon l'indication: CMDBS ou Heparine (5000 µg): βTGF (50 ng):Trypsine(500 µg)	% d'activité inhibitrice de l'incorporation de thymidine tritiée dans des CCL64 (après dilution du mélange d'incubation de 50 fois.
Tampon d'incubation seul	0
CMDBS (5000 µg)	0
Heparine (5000 µg)	0
Trypsine (1000 µg)	0
TGF beta (50 ng)	100
βTGF + CMDBS (batch AM26)	100
βTGF + Heparine	100
βTGF + Trypsine	5
βTGF + CMDBS+Trypsine	7.5
βTGF + Heparine + Trypsine	10

TABLEAU 2  
Effet non inhibiteur du CMDBS vis-à-vis  
de la trypsine

Trypsine (10ug/ml)+ S87	100
Trypsine+S87+5ug/ml CMDBS	100
Trypsine+S87+50ug/ml CMDBS	100
Trypsine+S87+500ug/ml CMDBS	100
Trypsine+S87+STBI	0

TABLEAU 3  
Origine, activité anticoagulante et  
composition partielle du Mésoglycan  
et du Sulodexide (informations du fournisseur)

5

	Sulodexide	Mésoglycan
Origine	duodenum de porc	aorte
Activité anticoagulante	50-70 IU/mg	< 50 IU /mg
Composition chimique		
Dermatane sulfate	20 - 35 %	25 - 60 %
Chondroïtine Sulfate	2-7%	3-15%
Héparane sulfate	+	+

TABLEAU 4  
Protection du TGFbêta par divers polymères

5	TGF bêta	100 %
	TGF bêta + trypsine	0 %
	TGF bêta + mésoglycan	100 %
	TGF bêta + mésoglycan + trypsine	50 %
	TGF $\beta$ + HSM	100 %
	TGF $\beta$ + HSM + trypsine	75 %
	TGF beta + sulodexide	100 %
	TGF beta + sulodexide + trypsine	20 %
	TGF $\beta$ + HSS	100 %
	TGF $\beta$ + HSS + trypsine	45 %
	TGF bêta + Dextrane	100 %
	TGF bêta + Dextrane + trypsine	0 %
	TGF bêta + Dextrane Sulfate	100 %
	TGF bêta + Dextrane Sulfate + trypsine	0 %
	TGF bêta + Sucrase	100 %
	TGF bêta + Sucrase + trypsine	0 %

HSM = Héparanes Sulfates purifiés à partir du Mésoglycan

HSS = Héparanes Sulfates purifiés à partir de Sulodexide



TABLEAU 5Protection du FGF par divers polymères

		PROTECTION EN %
	FGF seul	100
5	FGF + Trypsine	0
	FGF + Trypsine + Héparine	100
	FGF + Trypsine + Mésoglycan	75
	FGF + Trypsine + Sulodexide	70
	FGF + Trypsine + Mésoglycan traité	0
10	Héparinase	
	FGF + Trypsine + Sulodexide traité	0
	Héparinase	
	FGF + Trypsine + Héparine Traité	0
	Héparinase	
15	FGF + HSM + Trypsine	95
	FGF + HSS + Trypsine	90

**TABLEAU 6**  
Inhibition des activités de l'élastase et de  
la plasmine

5

10

15

20

Composés testés	Elastase Leucocytaire	Plasmine
	IC <sub>50</sub> en µg/ml	IC <sub>50</sub> en µg/ml
CMDBS lot AM6	2,2	1,5
T40	> 100	> 100
CMDBS lot EM5	10	7
T10 CMD2B	50	53
T10 5CMD1B	> 100	> 100
T10 3CMD	> 100	> 100
T10	> 100	> 100
Mesoglycan	72	65
HS Mesoglycan	20	22
Sulodexide	79	75
HS Sulodexide	25	20
Héparine	1,8	
Lipo-héparine		0,5

HSM = Héparanes Sulfates purifiés à partir du Mésoglycan

HSS = Héparanes Sulfates purifiés à partir de Sulodexide

TABLEAU 7

Traitement	Doses en $\mu\text{g/kg}$ PO	Scores	Varlations
Témoins	-	3,75 $\pm$ 0,17	
PGE2	200	1,4 $\pm$ 0,35	-63%
CMDBS	100	1,6 $\pm$ 0,25	-56%
	300	3,2 $\pm$ 0,33	-16%
	1000	3,1 $\pm$ 0,35	-17%

TABLEAU 8

Traitements	Doses	Nombres de rats	Concentration de Bleu Evans en $\mu\text{g/g}$ de côlon <sup>1</sup>
Témoins		5	0,17 $\pm$ 0,03
TNB		5	0,87 $\pm$ 0,14
CMDBS	100 $\mu\text{g/kg}$	6	0,54 $\pm$ 0,16
	300 $\mu\text{g/kg}$	6	0,45 $\pm$ 0,12 **
	1000 $\mu\text{g/kg}$	6	0,78 $\pm$ 0,11

### REVENDEICATIONS

1. Utilisation d'au moins un polymère ou un biopolymère, appelés HBGFPP, à l'exclusion du mésoglycan, protégeant spécifiquement les facteurs de croissance des familles des FGF et TGFbêta de la dégradation tryptique et n'inhibant pas de manière significative la coagulation, pour la fabrication d'un médicament pour le traitement des inflammations.

2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que le polymère ou biopolymère présente une activité anti-coagulante inférieure à 50 unités internationales par mg de polymère.

3. Utilisation selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisée en ce que ledit polymère présente une activité anti-complément.

4. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que ledit polymère n'active substantiellement pas le système du complément.

5. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que ledit polymère inhibe substantiellement les activités protéasiques de l'élastase et/ou de la plasmine.

6. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que ledit polymère ou biopolymère est un polysaccharide.

7. Utilisation selon la revendication 6, caractérisée en ce que ledit polysaccharide est principalement composé de résidus glucose.

8. Utilisation selon la revendication 6, caractérisée en ce que le polysaccharide comprend des résidus glucosamine et/ou d'acide uronique.

9. Utilisation selon la revendication 8, caractérisée en ce que le polysaccharide comprend des

dimères glucosamine-acide uronique.

10. Utilisation selon l'une des revendications 8 et 9, caractérisée en ce que ledit polysaccharide est un glycosaminoglycane éventuellement associé à un lipide, un peptide ou un protide, ou un sulfate d'un de ces composés.

11. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que ledit polysaccharide est un dextrane substitué.

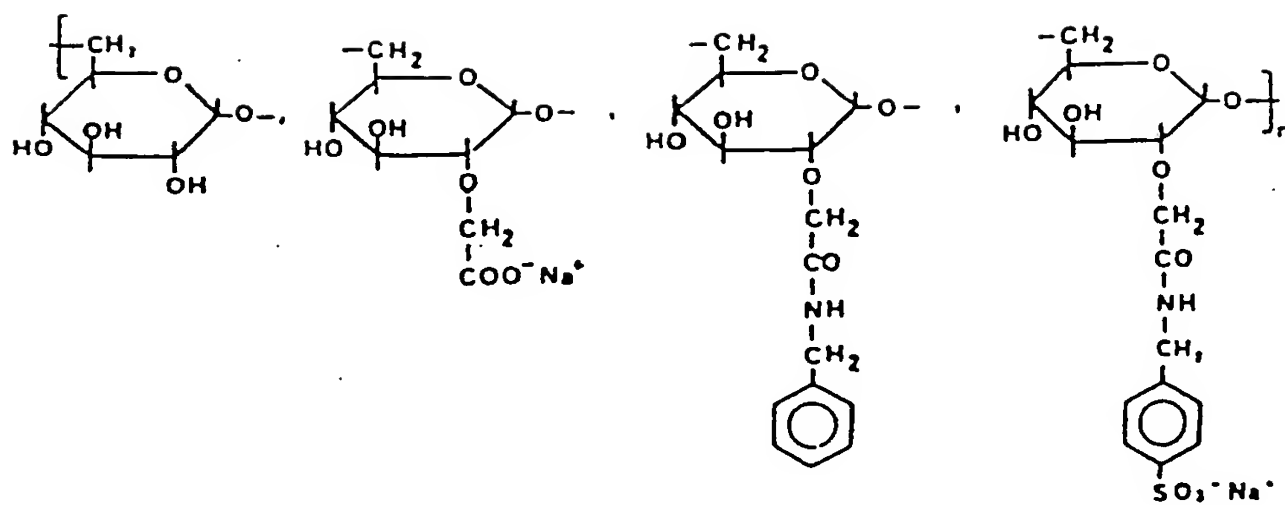
12. Utilisation selon la revendication 11, caractérisée en ce que ledit polysaccharide est un CMDBS.

13. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que ledit polymère est de nature non-osidique.

14. Composition pharmaceutique pour le traitement des inflammations contenant au moins un polymère tel que défini dans l'une des revendications 1 à 13 en association avec au moins un excipient pharmacologiquement acceptable.

15. Composition selon la revendication 14, caractérisée en ce qu'elle contient entre environ 10 et 2500  $\mu\text{g}$  de polymère ou de biopolymère/ml de composition.

FIG. 1



D

CM

B

S

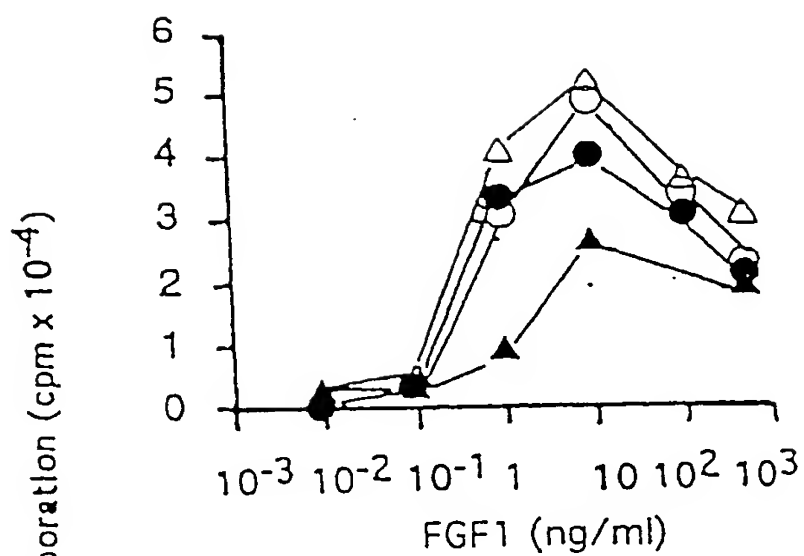


FIG. 2 A

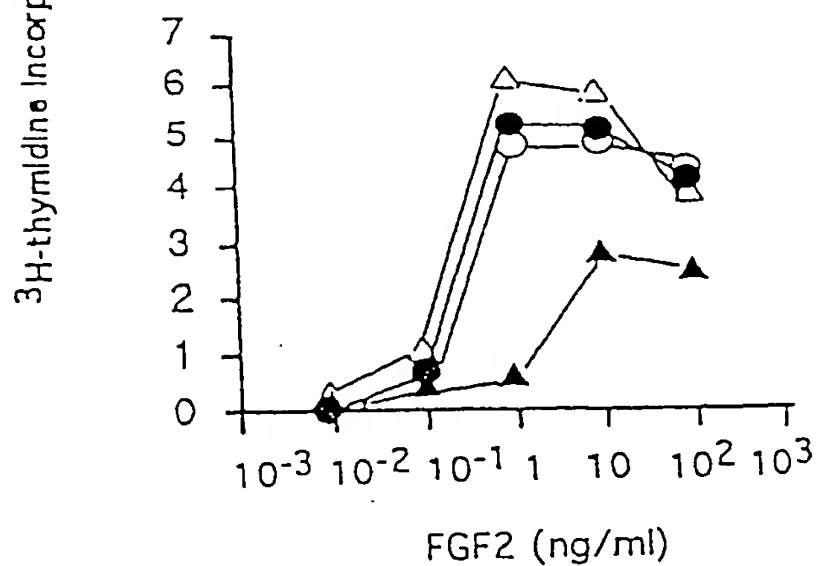


FIG. 2 B

- ▲ FGF
- FGF plus héparine
- FGF plus mésoglycane
- △ FGF plus sulodexide

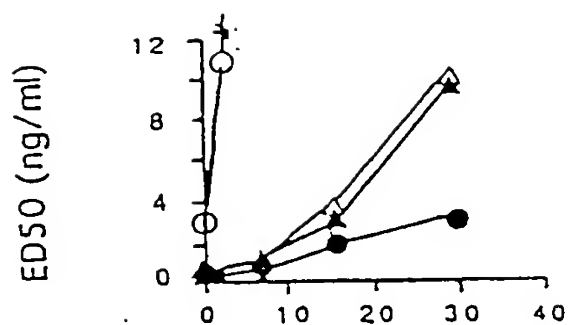


FIG. 3 A

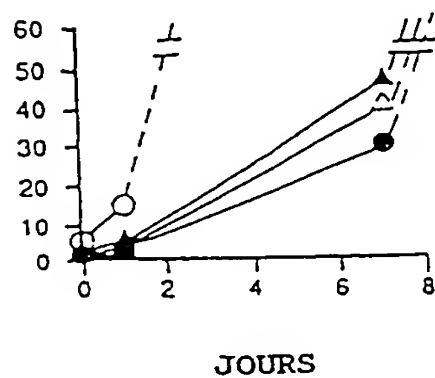


FIG. 3 B

- FGF<sub>1</sub>
- FGF<sub>1</sub> plus héparine
- ▲ FGF<sub>1</sub> plus mésoglycane
- △ FGF<sub>1</sub> plus sulodexide



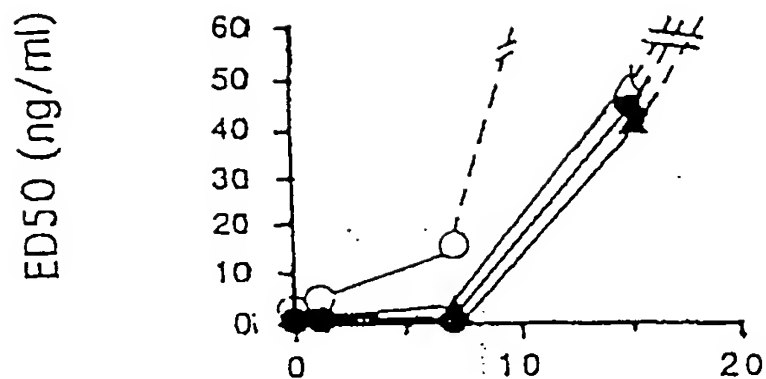


FIG. 4 A

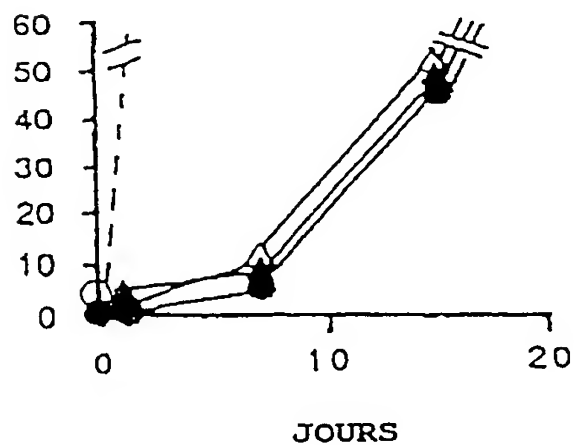


FIG. 4 B

- △ FGF<sub>2</sub>
- FGF<sub>2</sub> plus héparine
- ▲ FGF<sub>2</sub> plus mésoglycane
- FGF<sub>2</sub> plus sulodexide

FIG. 5 A

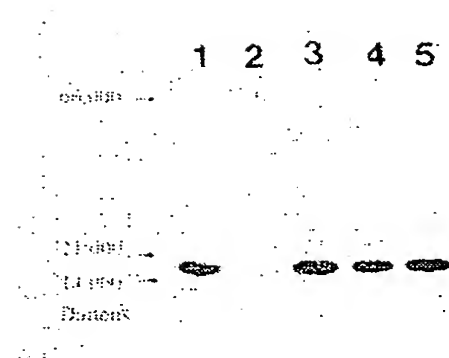


FIG. 5 B

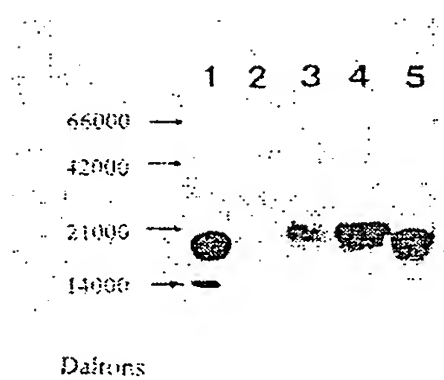


FIG. 6A

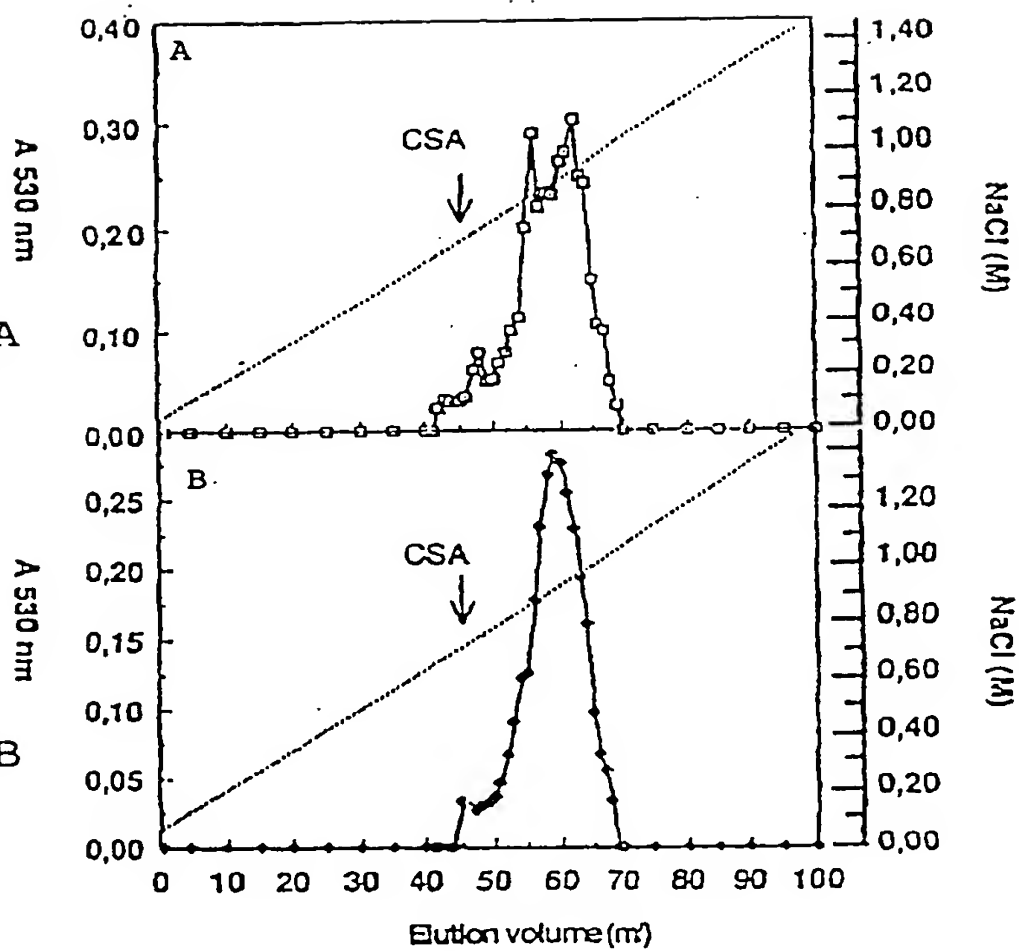


FIG. 6B

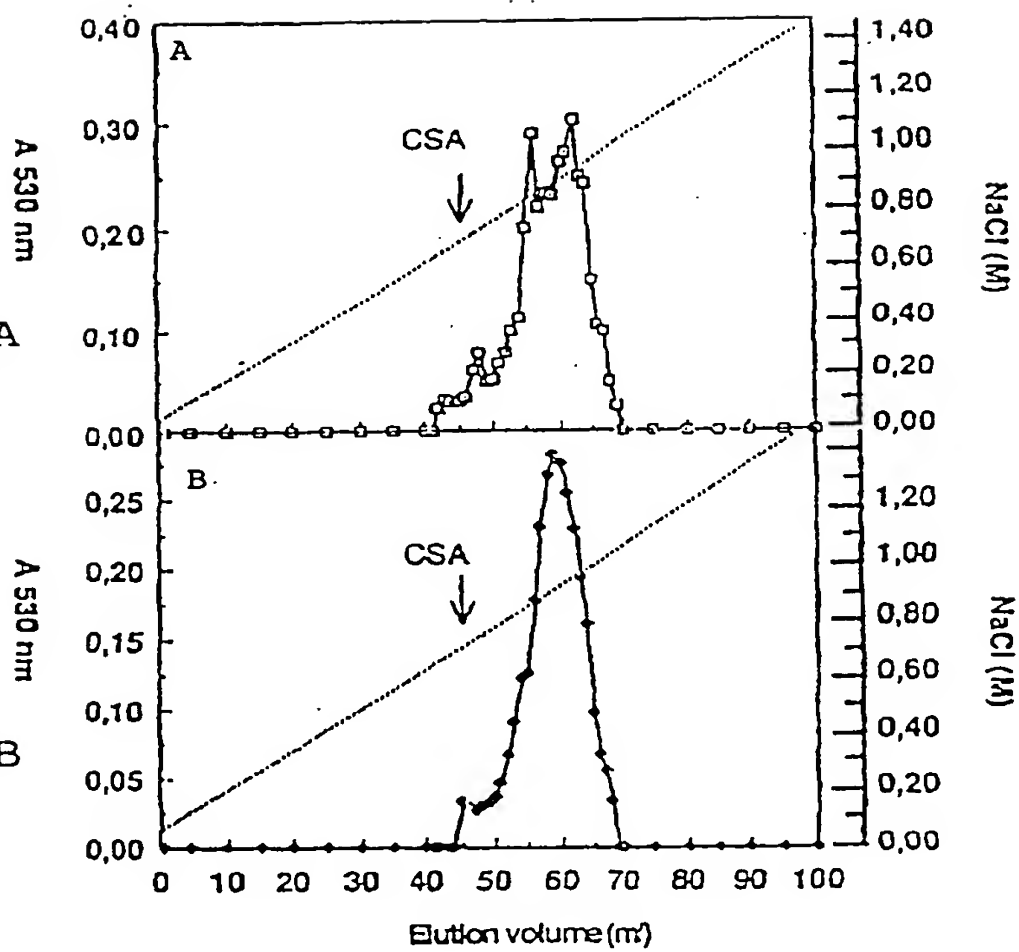




FIG. 7A



FIG. 7B

FIG. 8A

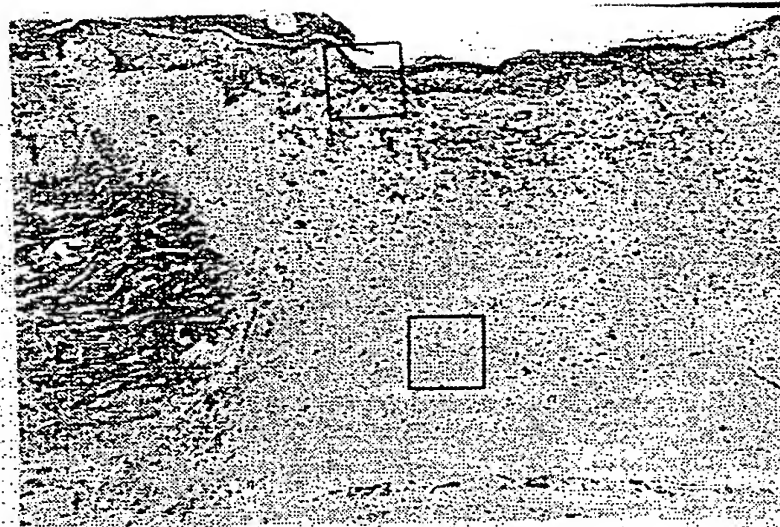


FIG. 8B

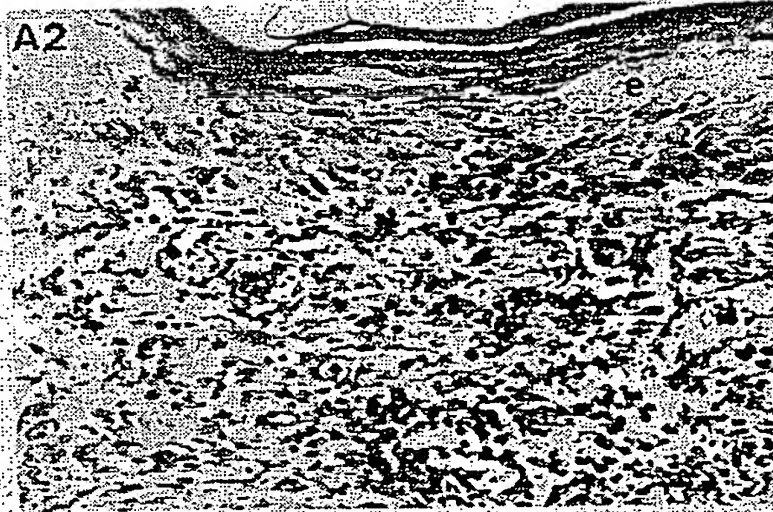


FIG. 8C

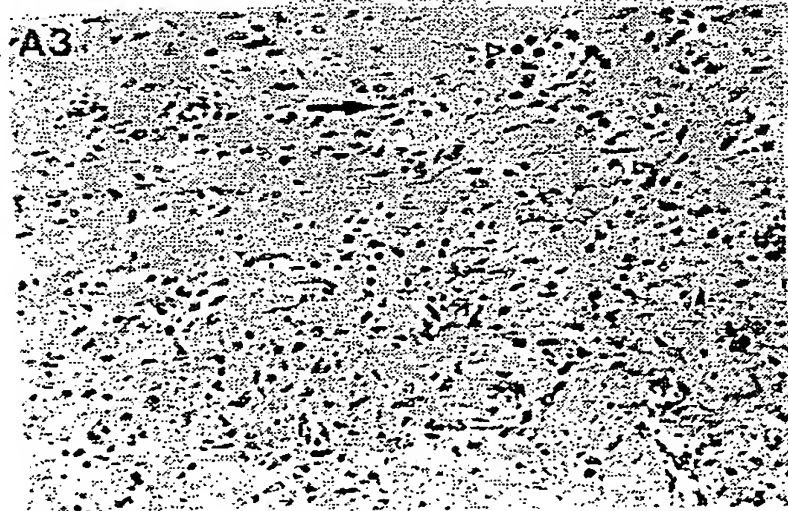


FIG. 8D

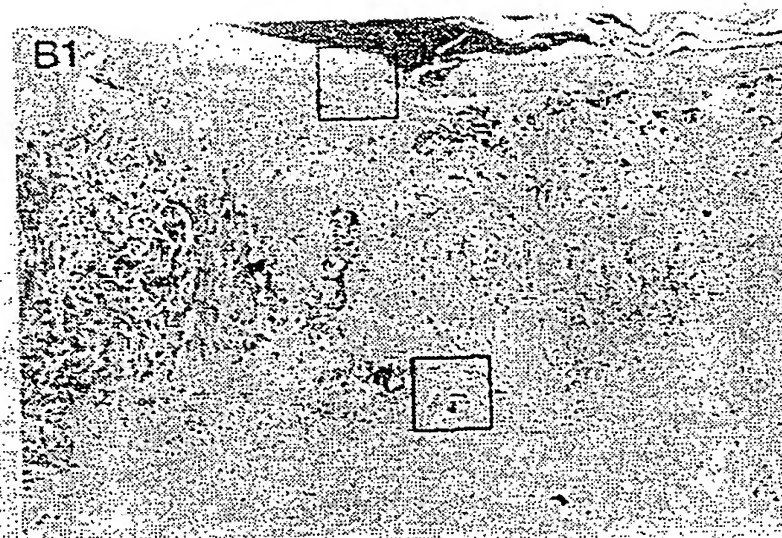


FIG. 8E

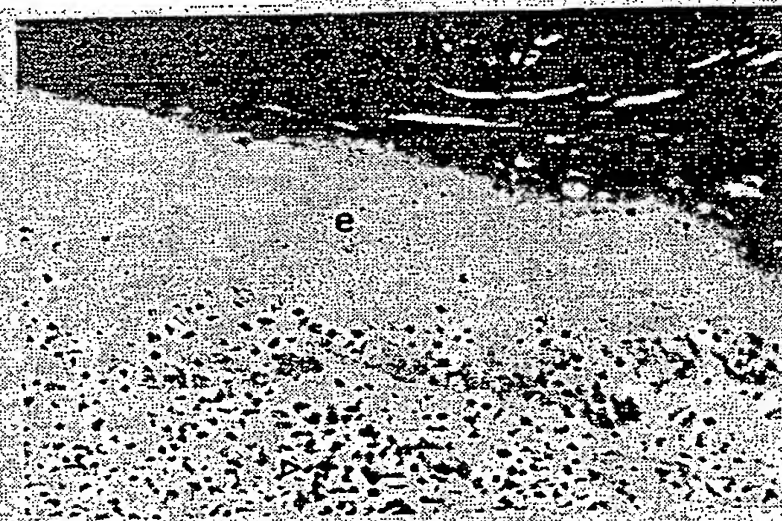
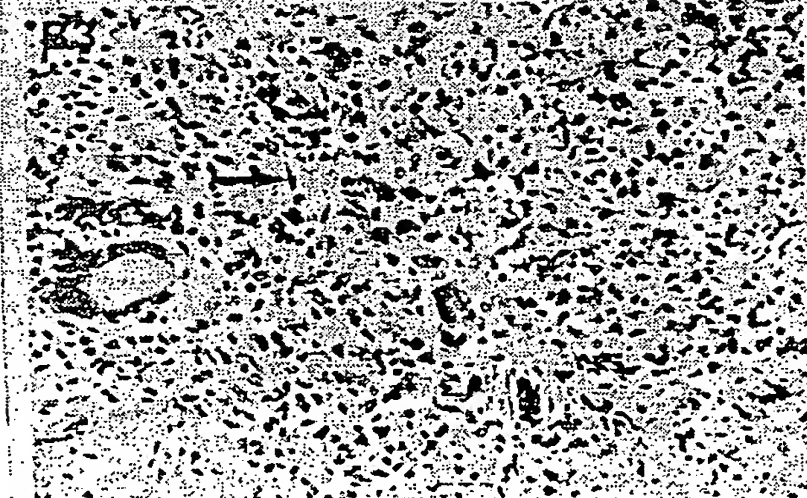


FIG. 8F





11/11

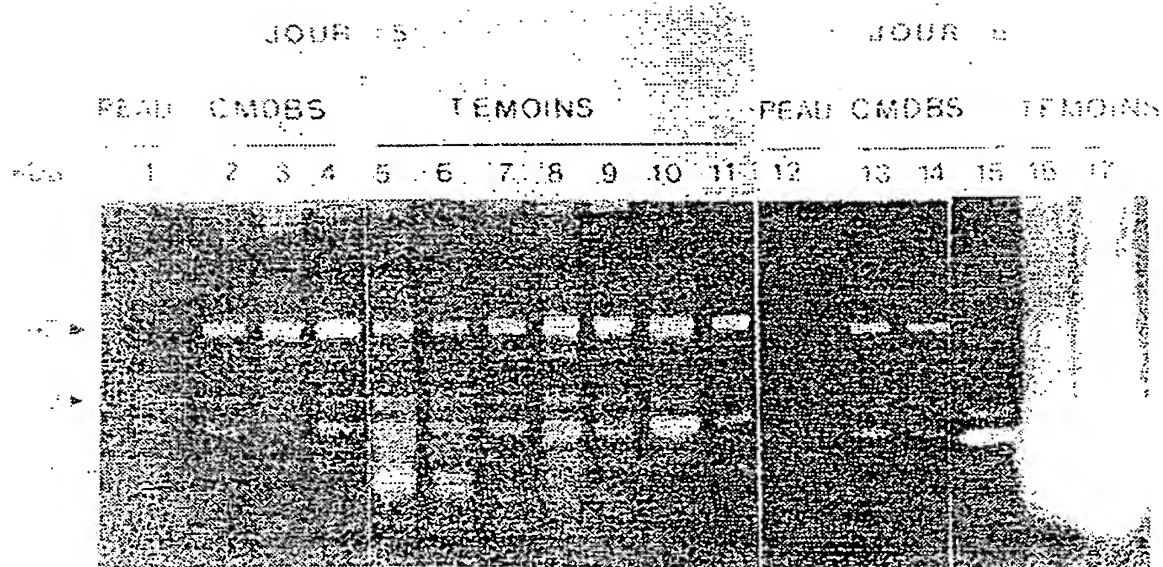


FIG .9



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat. Application No  
PCT/FR 95/00400

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 A61K31/725

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MINERVA MED., vol. 80, no. 4, 1989 pages 397-403, L. DRAGANI ET AL. 'A heparin-glucuronilglucoasminoglycan for topical use.' * abstract in english* ---	1, 8, 14
A	MINERVA DIETOL. GASTROENTEROL., vol. 31, no. 2, 1985 pages 311-315, A. SAGGIORO ET AL. 'Treatment of hemorrhoidal syndrome with mesoglycan sulfate.' * abstract in english* ---	

-/--

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 July 1995

Date of mailing of the international search report

28.07.95.

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Klaver, T

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat'l Application No  
PCT/FR 95/00400

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>BOLL. CHIM. FARM., vol. 119, no. 8, 1980 pages 487-498, G. CORBELLI ET AL. 'Evaluation of the stability of vessel, a glycosaminoglycan sulfate of extractive origin, and heparin in human digestive juices.'</p>	
A	<p>FR-A-2 644 066 (THERAPEUTIQUES SUBSTITUTIVES) 14 September 1990 cited in the application</p>	
A	<p>FR-A-2 461 724 (FOUGNOT ET AL.) 6 February 1981 cited in the application</p>	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 95/00400

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR-A-2644066	14-09-90	AT-T- 106743	15-06-94
		AU-A- 5283890	09-10-90
		CA-A- 2048638	10-09-90
		DE-D- 69009748	14-07-94
		DE-T- 69009748	22-09-94
		EP-A- 0462194	27-12-91
		ES-T- 2057544	16-10-94
		WO-A- 9010456	20-09-90
		JP-T- 4505756	08-10-92
FR-A-2461724	06-02-81	AT-T- 10748	15-12-84
		CA-A- 1188298	04-06-85
		EP-A, B 0023854	11-02-81
		EP-A, B 0090100	05-10-83
		JP-B- 1040630	30-08-89
		JP-C- 1558542	16-05-90
		JP-A- 56018877	23-02-81
		US-A- 4755379	05-07-88

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No  
PCT/FR 95/00400

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 6 A61K31/725

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 6 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	MINERVA MED., vol. 80, no. 4, 1989 pages 397-403, L. DRAGANI ET AL. 'A heparin-glucuronilglucoasminoglycan for topical use.' * abrégé en anglais *	1,8,14
A	MINERVA DIETOL. GASTROENTEROL., vol. 31, no. 2, 1985 pages 311-315, A. SAGGIORO ET AL. 'Treatment of hemorrhoidal syndrome with mesoglycan sulfate.' * abrégé en anglais * --- -/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "I" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

19 Juillet 1995

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

28.07.95.

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patendaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Klaver; T

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No  
PCT/FR 95/00400

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>BOLL. CHIM. FARM., vol. 119, no. 8, 1980 pages 487-498, G. CORBELLI ET AL. 'Evaluation of the stability of vessel, a glycosaminoglycan sulfate of extractive origin, and heparin in human digestive juices.' ---</p>	
A	<p>FR-A-2 644 066 (THERAPEUTIQUES SUBSTITUTIVES) 14 Septembre 1990 cité dans la demande ---</p>	
A	<p>FR-A-2 461 724 (FOUGNOT ET AL.) 6 Février 1981 cité dans la demande -----</p>	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 95/00400

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR-A-2644066	14-09-90	AT-T- 106743	15-06-94
		AU-A- 5283890	09-10-90
		CA-A- 2048638	10-09-90
		DE-D- 69009748	14-07-94
		DE-T- 69009748	22-09-94
		EP-A- 0462194	27-12-91
		ES-T- 2057544	16-10-94
		WO-A- 9010456	20-09-90
		JP-T- 4505756	08-10-92
FR-A-2461724	06-02-81	AT-T- 10748	15-12-84
		CA-A- 1188298	04-06-85
		EP-A, B 0023854	11-02-81
		EP-A, B 0090100	05-10-83
		JP-B- 1040630	30-08-89
		JP-C- 1558542	16-05-90
		JP-A- 56018877	23-02-81
		US-A- 4755379	05-07-88